

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21592522
 研究課題名（和文）顎運動における神経可塑性についての研究

研究課題名（英文）Neural plasticity of jaw movement system

研究代表者
 榎本 明史（ENOMOTO AKIFUMI）
 大阪大学・歯学研究科・招聘教員
 研究者番号：70432549

研究成果の概要（和文）：三叉神経運動ニューロンが単一神経細胞内において神経可塑性を持ち、その興奮性を変化させる特性が存在することが解明された。これが神経活動の特性として FI（Frequency-current）curve の左方移動によるものであることを我々は確認した。また、この神経可塑性が細胞内カルシウムに依存していることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Applying brainstem transection techniques to the neonatal rat brainstem in vitro, we found that the activity of the motoneuron population recorded from the motor branch of the trigeminal nerve exhibited LTP-IE. We thus demonstrated the usefulness of this type of preparation for the study of rudimentary oral-motor activity and observed changes in TMN excitability. In addition, on testing with the whole-cell patch-clamp method, TMNs exhibited a significant increase in excitability with a leftward shift in F-I curves generated with depolarizing current injections. These findings indicate that TMNs exhibit LTP of intrinsic excitability. Blocking the calcium influx prevented LTP-IE. These results indicate that TMNs shows LTP-IE, and calcium influx is necessary for induction of LTP-IE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：口腔外科学

キーワード：神経可塑性、三叉神経、顎運動、脳幹、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

三叉神経系の神経ネットワークの発達は、吸綴や咀嚼といった顎運動の生理学的機能の発達に大きな影響をあたえている。脳幹内の神経細胞のそれぞれのつながりや、個々の神経細胞の神経活動誘発時の電気生理学的メカニズムに関

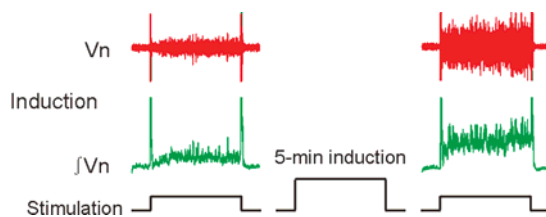
しては多くの報告があるが、顎運動誘発に関わる三叉神経系における神経可塑性についての報告はほとんどない。神経細胞のネットワークは、使われれば使われるほど伝達効率が増したり、枝分かれして数自体が増えたりすることが認められる。これは可塑性と呼ばれており、機関番号

機関番号

神経系における発達や機能の回復に重要な働きかけをしていると考えられている。

我々のこれまでの研究により、三叉神経系の第一次感覚神経や運動ニューロンが単一神経細胞内において神経可塑性を持ち、その興奮性を変化させる特性が存在することを発表した。これは、神経間を通した三叉神経感覚系からの刺激により、神経細胞の活動性が高まり、顎運動の生理学的活動性を高めることとなることを示唆させるものである。

(Okamoto et al., 2007 International Neuroscience Congress 2007 下図：三叉神経運動根からの細胞外記録。三叉神経運動ニューロンが Induction により興奮性を高めることを示す。)



吸綴障害、咀嚼障害を代表とするオーラルディスクネジアの治療には、三叉神経系の顎運動における神経生理学的メカニズムを解明することは不可欠であることは明白である。このオーラルディスクネジアは、その病態が不明で、それゆえ治療法も確立していない。様々な要因により生じた機能の低下を回復させるためには、これら神経系の神経可塑性のメカニズムを解明することが必要になる。これらの研究は、吸綴障害や咀嚼障害をはじめとする顎運動機能障害の治療に対しての有用な研究となると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 三叉神経運動ニューロンの神経可塑性に関する神経レベルでの発現について
- (2) 三叉神経運動ニューロンの神経可塑性を誘発するメカニズムの詳細な検討

3. 研究の方法

- (1) 実験には、SD系ラット（日齢1・4）の“器官付き培養脳幹”を用いる。すでに単一細胞レベルで、三叉神経運動ニューロンが、神経可塑性を示すことが我々の研究にて明らかとなった。では、具体的に *in vivo* に近い状態で、どのような活動として顎運動の興奮

能力が増幅されるのかを細胞外神経活動記録法を用いた実験系にて実施する。“培養脳幹”を用いた細胞が電気活動を検討する実験系は、過去に我々の研究方法として確立している。また、シナプスを介した他の神経細胞からの興奮性シグナルの入力を防ぐため、両実験ともに、シナプス伝達に対する拮抗薬を投与した状態で行う。同じくSD系ラット（日齢1・4）の培養脳幹スライスを用いる。単一細胞の三叉神経運動ニューロンにおいて、細胞が興奮するためには、イオン電流が細胞膜を通過することで活動電位が誘発されることは周知である。これらのイオン電流の変化が細胞特性に変化を与えていることが考えられる。顕微鏡下にて同定した三叉神経運動ニューロンから Patch-clamp 法を用いて神経特性（特に、神経可塑性が生じた神経細胞のイオン電流の変化）を検討する。この実験には、脳幹スライス（300 μm）を使用し、人工脳幹脊髄溶液下（95%酸素・5%窒素にて飽和された溶液の使用）にて還流し、細胞内液となる溶液も人工的に作成したものを使用する。記録には、

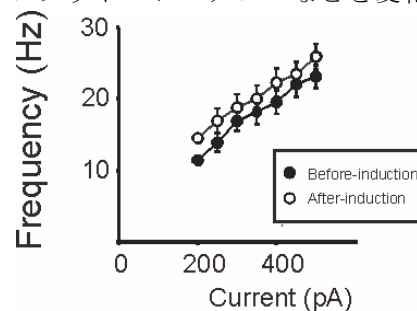
Patch-clamp voltage-clamp 法を用い、神経細胞の intrinsic な property の変化を検討する。

- (2) 三叉神経運動ニューロンの神経可塑性を誘発するメカニズムの詳細な検討に関しては、細胞内外のカルシウムについて検討する。細胞外のカルシウムはゼロカルシウム溶液を用いて、細胞内カルシウムのは BAPTA を使用してカルシウムをブロックした状態で、神経可塑性の活動を検討する。

4. 研究成果

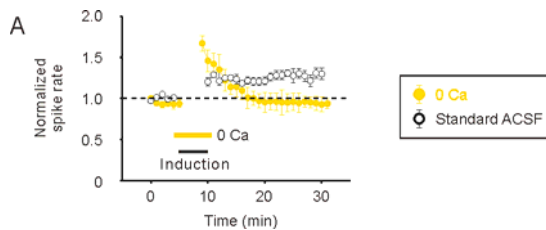
三叉神経運動ニューロンが単一神経細胞内において神経可塑性を持ち、その興奮性を変化させる特性が存在することが解明された。これが神経活動の特性として FI (Frequency-current) curve の左方移動によるものであることを確認した。

細胞の神経特性となる静止膜電位、インプットレジスタンスなどを変化させ

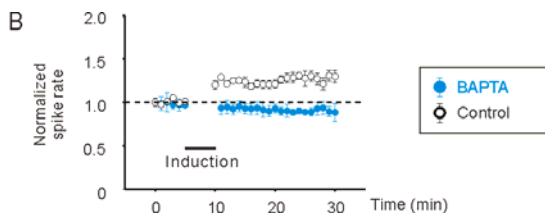


ず、神経活動性が長期に変化していることが確認された。また実験にて、ナトリウムのコンダクタンスが増加することを確認した。

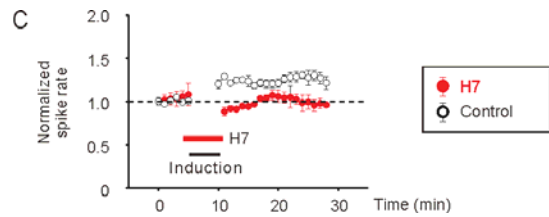
三叉神経運動ニューロン自体のintrinsicな神経興奮性が上昇しているが、これは細胞内カルシウムが関連していることが確認された。細胞外カルシウムの濃度をゼロにした状態にてinductionを加えたところ、一過性に興奮性の上昇が認められたが、その後すぐに神経の活動性は、オリジナルの状態に戻ることが認められた。これにより、細胞外のカルシウムの濃度が関与していることが示された。(図A)



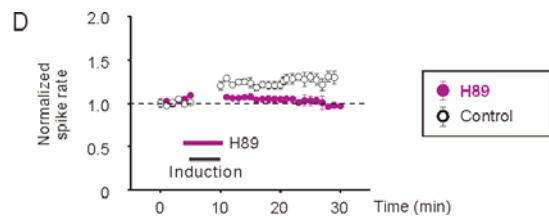
次に、細胞内カルシウムの依存性を検討するために、細胞内カルシウムのキレート効果によるブロッカーであるBAPTAを使用して、興奮性の検討を行った。結果、神経可塑性は認められなかった。これにより、細胞内のカルシウムが神経可塑性に管レしていることが示された。(図B)



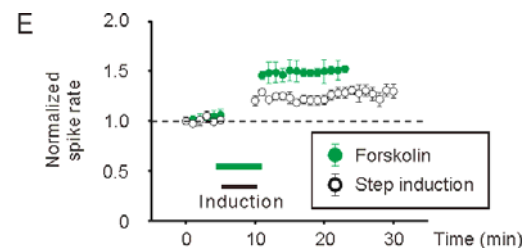
さらに、細胞内カルシウムの関連性が示されたところで、プロテインキナーゼ A (PKA)、プロテインキナーゼ C、カルモジュリンの関与に関して検討した。まずは、広域のプロテインキナーゼのブロッカーであるH7を使用して、プロテインキナーゼ A (PKA)、プロテインキナーゼ C、カルモジュリンなどのプロテインキナーゼを全般的にブロックした状態で、神経可塑性について検討した。結果、H7により三叉神経運動ニューロンにて神経可塑性の発生は、認められなかった。(図C)



プロテインキナーゼ A のブロッカーである。H89をしようすると、同様に三叉神経運動ニューロンにおいて神経可塑性の発生はブロックされた。プロテインキナーゼ C のブロッカーや、カルモジュリンのブロッカーを使用したところ神経可塑性の発生はおおきく阻害されなかった。(図D)



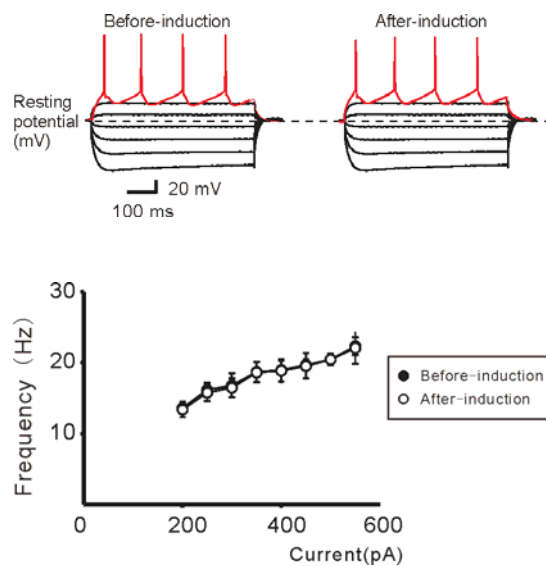
次に直接的にサイクリック AMP (cAMP) の activator である forskolin を投与することで、神経活動の変化を検討した。cAMP が直接、活動することで、それに伴い、PKA が activate するため、この効果を検討した。三叉神経運動ニューロンは、forskolin の投与にて、活動性を高めることが示唆された。さらにこの投与後の状態にて、induction を加えることで、神経可塑性が生じるかを検討した。Forskolin 投与下では、induction による三叉神経運動ニューロンにおける神経可塑性は認めることが出来なかった。(図E)



これらのことより、三叉神経運動ニューロンは、長期の神経可塑性を有し、之には、FI カーブにおける左方移動が原因となっていることが認められた。この詳細な機能においては、細胞内カルシウムが関与しており、特にプロテインキナーゼ A (PKA) が重要なファクターである

ことが認められた。

三叉神経運動ニューロンと比較して、舌下神経運動ニューロンに関しての神経可塑性に関して検討した。舌下神経運動ニューロンも口腔機能をつかさどる重要な運動神経の一つである。三叉神経運動ニューロンの検討と同様の実験方法にて、舌下神経運動ニューロンに対して induction を加え、長期神経可塑性について検討した。三叉神経運動ニューロンにて認められた長期神経可塑性は、舌下神経運動ニューロンにては、みとめられないことが確認された。(下図)



三叉神経運動ニューロンは、口腔機能を司る運動神経ニューロンとして機能しており、生後、吸綴から咀嚼への機能を変化させていくことが生理的に認められるが、今回の研究においては、生後0から4日目のSDラットを使用していることから、これらの機能を表現した生理的運動が、長期神経可塑性を司っていることを示唆する結果を示している可能性が考えられた。

一方、舌下神経の生理学的運動は、出生児にすでに嚥下運動が完成されており、三叉神経のごとく、生理的運動の表現が変化するような behavior をとらないことが、今回の結果と関連している可能性が示唆された。これは、胎生期に舌下神経の運動機能がある程度、完成されていることが過去の報告にてなされていることと関連づけられると考える。

本実験の結果より、顎口腔機能の生理的運動が、可塑性をしめすことが示唆され、これが、哺乳障害、咀嚼障害などの病的な状態を治療していくことにつながる可能性につながる事が考えられ

る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yamanishi T, Takao K, Koizumi H, Ishihama K, Nohara K, Komaki M, Enomoto A, Yokota Y, Kogo M. : α 2-Adrenoceptors Coordinate Swallowing and Respiration. J Dent Res. 査読有り 2010 Mar;89(3):258-63.
- ② Okamoto R, Enomoto A, Koizumi H, Tanaka S, Ishihama K, Kogo M. : Long-term potentiation of intrinsic excitability in trigeminal motoneurons. Brain Res. 査読有り 2010Feb 2;1312:32-40.
- ③ Koizumi H, Nomura K, Yokota Y, Enomoto A, Yamanishi T, Iida S, Ishihama K, Kogo M. : Regulation of trigeminal respiratory motor activity in the brainstem. J Dent Res. 査読有り 2009Nov;88(11):1048-53.
- ④ NMDA 誘発性顎運動時の三叉神経中脳路核ニューロンの神経活動 榎本明史, 岡本怜子, 妹尾日登美, 草山守生, 濱田傑, 古郷幹彦 日本顎関節学会雑誌 査読有り (0915-3004)21 巻 2 号 Page99-104(2009.08)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Calcium-dependent of long-term potentiation in trigeminal motoneurons. Sanam Bakhshishayan, Akifumi Enomoto, Tadataka Tsuji, Masataka Higuchi, Ushimura Ayako Tadashi Yamanishi, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo International Neuroscience Congress 2011, 2011/11/16, Washington DC, USA.
- ② Long term potentiation of intrinsic excitability in hypoglossal and trigeminal motoneurons. Sanam Bakhshishayan, Akifumi Enomoto, Tadataka Tsuji, Masataka Higuchi, Tadashi Yamanishi, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo 日本口腔外科学会 2011/10/10 大阪市、大阪府
- ③ 顎運動における神経可塑性の検討 榎本明史, 岡本怜子, 古郷幹彦, 濱田傑 日本顎関節学会 2011/7/15 広島市、広島県
- ④ NMDA 誘発性顎運動時の三叉神経中脳路核ニューロンの神経活動 榎本明史, 小泉英彦, 田中晋, 岡本怜子, 中原寛和, 濱田傑, 古郷幹彦 日本口腔外科学会 2009/10/10 札幌市、北海道
- ⑤ 三叉神経運動ニューロンにおける神経可塑性についての研究 岡本怜子, 榎本明

史, 小泉英彦, 田中晋, 古郷幹彦 日本
口腔外科学会 2009/10/10 札幌市、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 明史 (ENOMOTO AKIFUMI)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号： 70432549